昆虫学报 *Acta Entomologica Sinica*，February 2005，48(1)：13－17 ISSN 0454-6296

美洲大蠊变应原 Cr PI 的表达、纯化与免疫学特性鉴定

高 波[1]，刘志刚[1,2*]，邢 苗[1,2]，徐 宏[2]，罗时文[2]，赖 仞[2]
(1. 深圳大学生命科学学院，深圳 518060；2. 深圳市微生物基因工程重点实验室，深圳 518060)

摘要：以阳性噬菌体克隆为模板，通过 PCR 扩增出目的基因片段并克隆入 T 载体，经测序证实为美洲大蠊 *Periplaneta americana* 变应原 Cr PI 后，将该基因亚克隆入表达载体 pGEX-5X-1。美洲大蠊变应原 Cr PI 在大肠杆菌中得到高效表达，但主要以包涵体形式存在于沉淀中。目的蛋白溶于 6 mol/L 盐酸胍并经稀释复性后，经 Glutathione Sepharose™ 4B 亲和层析，纯度达 90%以上。以蟑螂过敏病人血清进行免疫印迹检测，结果显示重组变应原具有良好的 IgE 结合活性。

关键词：美洲大蠊；重组变应原 Cr PI；蛋白表达；亲和层析；免疫印迹
中图分类号：Q966 **文献标识码**：A **文章编号**：0454-6296(2005)01-0013-05

Expression, purification and characterization of the American cockroach Cr PI allergen

GAO Bo[1], LIU Zhi-Gang[1,2*], XING Miao[1,2], XU Hong[2], LUO Shi-Wen[2], LAI Ren[2] (1. College of Life Sciences, Shenzhen University, Shenzhen, Guangdong 518060, China; 2. Shenzhen Key Laboratory of Microbial Genetic Engineering, Shenzhen, Guangdong 518060, China)

Abstract: Using the Cr PI clone from the λEXcell library as a template, the cDNA fragments were first generated by PCR techniques and then ligated into T vector. After being confirmed by DNA sequencing, the cDNA encoding the American cockroach Cr PI allergen was subcloned into pGEX-5X-1 and expressed as GST-fusion protein in the form of inclusion bodies. After being dissolved in 6 mol/L guanidine hydrochloride and renatured with a simple dilution method, the proteins of target were purified to above 90% purity by affinity chromatography with Glutathione Sepharose 4B. Tested with sera from subjects allergic to cockroach, the recombinant allergen was shown to possess good IgE-binding activity as determined by Western blotting.

Key words: American cockroach; *Periplaneta americana*; recombinant allergen Cr PI; protein expression; affinity chromatography; Western blotting

变态反应性疾病(过敏性疾病)是一种临床上的常见病和多发病，并有逐年增多的趋势，因此越来越受到世界各国卫生组织的关注。蟑螂与变态反应性疾病(如外源性哮喘等)有密切关系(Arruda *et al*., 1995)。蟑螂变应原能诱发机体产生特异性 IgE 抗体，导致哮喘及其他过敏性疾病(Bernton and Brown, 1964; Arruda and Chapman, 2001)。近年来，国外对德国小蠊 *Blattella germanica* 和美洲大蠊 *Periplaneta americana* 成虫基因克隆、表达和纯化进行了许多研究(Arruda *et al*., 1995; Wu *et al*., 1995)，但有关美洲大蠊若虫的未见有报道。赖乃揆等(1992)发现美洲大蠊若虫的反应原性和免疫原性均较成虫为强。刘志刚等(2001, 2002)利用蟑螂过敏病人血清中的特异性 IgE 从美洲大蠊若虫 cDNA 文库筛选出多个阳性克隆，经 BLAST 同源性分析发现其中之一与美洲大蠊变应原 Cr PI 基因有高度的同源性。

目前蟑螂变态反应性疾病的临床诊断及特异性免疫治疗是用未经标准化的蟑螂全虫粗浸液抗原，但天然变应原粗浸液存在较多不足之处(Nelson *et al*., 1996)，因此利用基因重组技术制备出具有活性的变应原无疑具有重要价值。本研究旨在通过基因工程的方法表达、纯化出具有 IgE 结合活性的美洲

基金项目：国家自然科学基金项目(39660073)；广东省科技重点项目(2003A3080502)；深圳市科技计划资助项目
作者简介：高波，男，1972 年生，现为江西医学院 2001 级硕士研究生
* 通讯作者 Author for correspondence, Tel.: 0755-26558940; Fax: 0755-26536629; E-mail: lzg@szu.edu.cn
收稿日期 Received: 2003-12-29; 接受日期 Accepted: 2004-07-07

大蠊变应原 Cr PI，为蟑螂过敏性疾病的诊断及进一步的实验研究提供基础。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌株和质粒：大肠杆菌 JM109 和 BL21 为本实验室保存菌株；PUCm-T 载体购自上海生工生物工程技术服务有限公司；pGEX-5X-1 为 Phamacia 公司产品。

1.1.2 主要试剂：限制性内切酶 *Eco*RⅠ和 *Not*Ⅰ，Glutathione Sepharose 4B 为法玛西亚公司产品；T4 DNA 连接酶和 Taq DNA 聚合酶为 Promega 公司产品；DNA 片段胶回收试剂盒和硝酸纤维素膜为 Millpore 公司产品；生物素标记的抗人 IgE 抗体，HRP 标记的链霉亲和素购自 KPL 公司。

1.1.3 血清标本：血清取自深圳市第一人民医院和广州医学院第二附属医院变态反应科。临床上选择对蟑螂皮试阳性的过敏性哮喘和过敏性鼻炎患者30例，所有患者无传染病史、粪检虫卵为阴性，静脉采血 5 mL，分离血清，选用法玛西亚 CAP 变应原自动检测系统或 MAST 变应原检测系统，收集蟑螂特异性反应阳性达 2 级或 2 级以上的患者血清，分装后低温保存。

1.2 方法

1.2.1 含 Cr PI 基因表达质粒的构建：以阳性噬菌体克隆为模板，T7，SP6 为引物，通过 PCR 扩增出目的 DNA 片段，克隆入 T 载体经测序证实为 Cr PI 后，提取质粒作 *Not*Ⅰ和 *Eco*RⅠ双酶切，暴露出基因片段两端的 *Not*Ⅰ和 *Eco*RⅠ粘端，与同样经过 *Not*Ⅰ和 *Eco*RⅠ双酶切的 pGEX-5X-1 表达载体，在 T4 DNA 连接酶作用下 16℃连接过夜。挑取可疑重组质粒进行双酶切鉴定及测序验证。

1.2.2 小规模融合蛋白 GST-Cr PI 的表达及可溶性分析：将重组质粒 pGEX-5X-1/Cr PI 先转化克隆菌株 JM109，再转化表达菌株 BL21。挑单菌落接种于含 100 mg/L 氨苄青霉素的 LB 液中，摇菌过夜，次日按 2% 的接种量转接新鲜 LB 液，37℃ 240 r/min 摇菌至 OD_{600} 为 0.6，加 IPTG 终浓度为 1 mmol/L，把转速调至 160 r/min 继续培养，分别在诱导后 1 h、2 h、3 h、4 h、5 h 和过夜取 1 mL 菌液，4℃离心弃上清，沉淀重悬于 50 μL 1×PBS，取 10 μL 与等量 2× SDS-PAGE 上样缓冲液混合，煮沸 3 min，取 8 μL 上样进行 SDS-PAGE 电泳来检测表达情况。在上述表达产物中，加入溶菌酶至终浓度为 0.5 g/L，室温放置 30 min 并反复冻融数次后，加 DNase Ⅰ至终浓度为 20 mg/L，室温放置 30 min，至不粘为止，12 000×g 离心 20 min，分别取上清和沉淀进行 SDS-PAGE。

1.2.3 重组融合蛋白的复性：将 20 mL 过夜重组子转接于 1 000 mL 新鲜 LB 液中，经 IPTG 诱导 5 h 后超声波破菌。沉淀经 1% Triton X-100 和 2 mol/L 尿素充分洗涤后，溶于 6 mol/L 盐酸胍中。以 BSA 为标准，用 Bradford 法测定其蛋白浓度并用包涵体溶解液调整浓度至 5 g/L。将制备好的包涵体缓慢滴入剧烈搅拌并冰浴冷却的复性液中（1×PBS pH 7.3，1 mmol/L PMSF，5 mmol/L DTT，5 mmol/L EDTA，0.5 mol/L 精氨酸，1 mmol/L GSH，0.2 mmol/L GSSG）4℃静置过夜，采用分步透析的方法，逐步去除精氨酸，然后用固态 PEG20000 对透析袋内复性液进行浓缩。

1.2.4 重组融合蛋白的纯化：取复性蛋白与 Glutathione Sepharose 4B 以 200∶1 的比例混合，4℃轻摇 1 h，500×g 4℃离心 5 min，去上清，用 10 倍体积冰预冷 1×PBS 洗涤 3 遍，用等体积还原型谷胱甘肽（10 mmol/L GSH，50 mmol/L Tris-HCl pH 8.0）进行洗脱，25℃轻摇 30 min，4℃ 500×g 离心 5 min，取上清，重复洗脱 4 遍，取 10 μL 上清进行 SDS-PAGE 分析。

1.2.5 重组蛋白的免疫印迹鉴定：表达产物经 10% SDS-PAGE 电泳分离，然后将蛋白质电转移到硝酸纤维素膜，用含 20 g/L 小牛血清蛋白的 TBST 37℃封闭 2 h；洗后与 1∶5 稀释的蟑螂过敏病人阳性血清 4℃孵育过夜，洗后加入经 TBST 稀释（1∶1 000）生物素标记的抗人 IgE 抗体，37℃孵育 1 h；洗后，加入经 TBST 稀释（1∶1 000）的 HRP 标记的链霉亲和素，37℃孵育 1 h；经充分洗涤后，将膜片放入新鲜配制的二氨基联苯胺（DAB）底物溶液中，于室温振摇至褐色区带充分显现，膜放重蒸水中洗涤，终止显色反应。

2 结果与分析

2.1 pGEX-5X-1/Cr PI 融合表达质粒的构建

通过 PCR 技术成功扩增出预期长度的片段（图 1），克隆入 T 载体测序证实为 Cr PI。亚克隆入 pGEX-5X-1 表达载体后，挑取可疑重组菌提取质粒，经 *Not*Ⅰ和 *Eco*RⅠ双酶切鉴定含有 Cr PI 基因片段（图 2），并经测序证实读框完全正确。

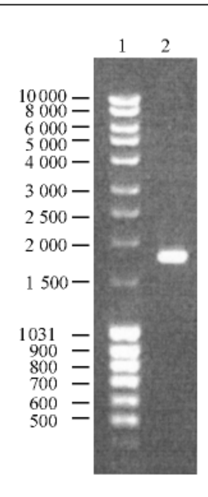


图 1　Cr PI 基因的 PCR 扩增结果

Fig. 1　Identification of PCR products of Cr PI gene by agarose gel electrophoresis

1. 标准分子量 Molecular weight marker;
2. Cr PI PCR 产物 PCR products of Cr PI.

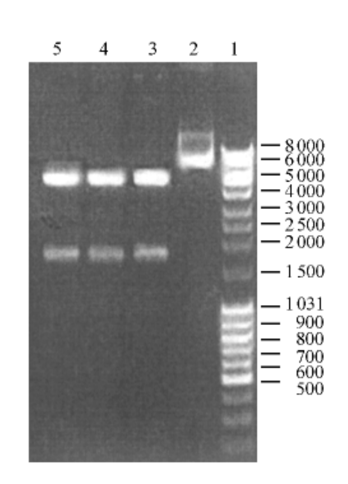


图 2　重组表达质粒 pGEX-5X-1/Cr PI 的双酶切鉴定

Fig. 2　Restriction enzymes digestion analysis of recombinant plasmid pGEX-5X-1/Cr PI

1. 标准分子量 Molecular weight marker; 2. pGEX-5X-1/Cr PI; 3～5. 双酶切后的重组质粒 *Eco* R Ⅰ and *Not* Ⅰ cleavage of pGEX-5X-1/Cr PI.

2.2　融合蛋白 GST-Cr PI 的诱导表达

表达产物经 10% SDS-PAGE 电泳，考马斯亮蓝染色结果显示在 66 kD 和 97 kD 之间出现明显表达带，并随诱导时间延长，融合蛋白量有加大趋势(图 3)。表达产物的可溶性分析表明融合蛋白主要以包涵体形式存在于沉淀中(图 4)。

2.3　融合蛋白的变复性与亲和层析纯化

诱导物沉淀经 Triton X-100 及 2 mol/L 尿素洗涤后，去除了大量杂蛋白，目的蛋白的纯度近 70%。由于融合蛋白带有 GST 标签，故可用 Glutathione Sepharose 4B 胶对融合蛋白进行亲和层析纯化；经 VILBER LOURMAT 公司的 BIO-ID 的纯度分析软件分析，目的蛋白的纯度达 90% 以上(图 5)。

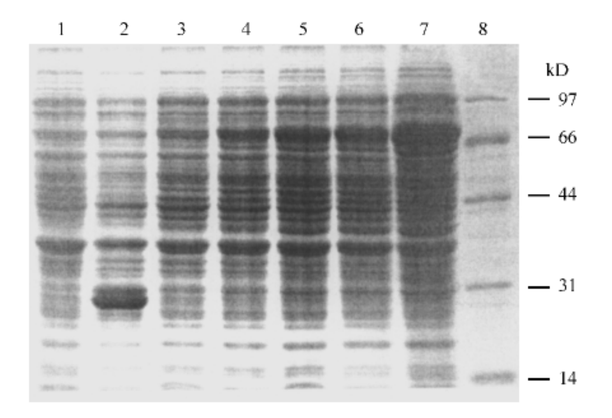


图 3　表达蛋白的动力学分析

Fig. 3　Kinetic test of expression of target protein

1. 含 pGEX-Cr PI 重组质粒 BL21 菌诱导前 BL21/pGEX-Cr PI before induction; 2. 含 pGEX-5X-1 质粒 BL21 菌诱导后 3 h BL21/pGEX-5X-1 induced after 3 h; 3～7. 含 pGEX-Cr PI 重组质粒 BL21 菌诱导后 2 h、3 h、4 h 和 5 h 及过夜 BL21/pGEX-Cr PI induced after 2 h, 3 h, 4 h, 5 h and overnight; 8. 标准分子量 Molecular weight marker.

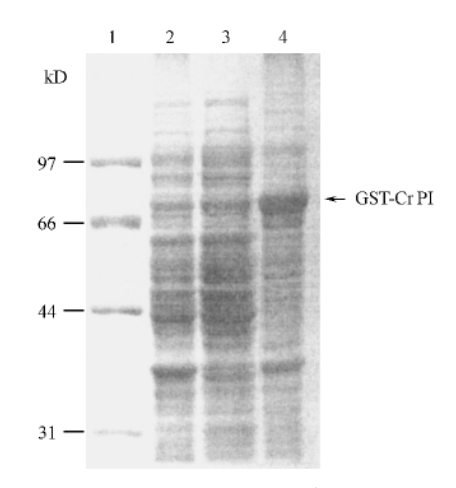


图 4　表达蛋白的可溶性分析

Fig. 4　10% SDS-PAGE analysis of the distribution of the expressed fusion protein in cellular fraction

1. 分子量标准 Molecular weight marker; 2. BL21/pGEX-Cr PI 诱导前 BL21/pGEX-Cr PI before induction; 3. 诱导菌破菌后上清 Soluble fractions of induced BL21/pGEX-Cr PI; 4. 诱导菌破菌后沉淀 Insoluble fractions of induced BL21/pGEX-Cr PI.

2.4　融合蛋白免疫印迹检测

Western 印迹结果显示融合蛋白在 80 kD 左右处显阳性结果，而经诱导的空质粒菌则没有(图 6)，可见表达的目的蛋白能被蟑螂过敏病人血清特异性 IgE 所识别，而 26GST 则不能。

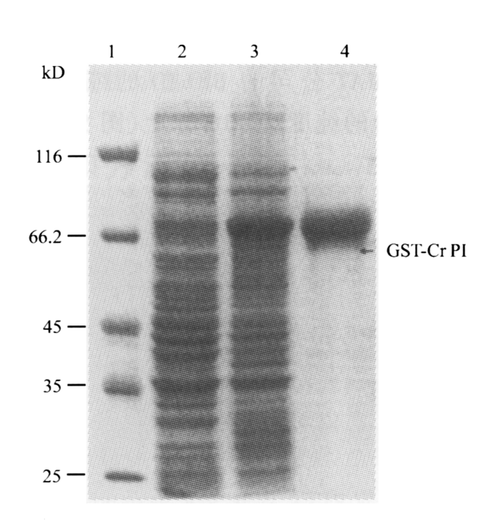


图 5　重组变应原的亲和层析纯化结果

Fig. 5　10% SDS-PAGE analysis of GST-Cr PI purification

1. 分子量标准 Molecular weight marker; 2. IPTG 诱导前样品 Sample before IPTG induction; 3. IPTG 诱导后样品 Sample after IPTG induction; 4. 纯化的融合蛋白 Purified GST-Cr PI.

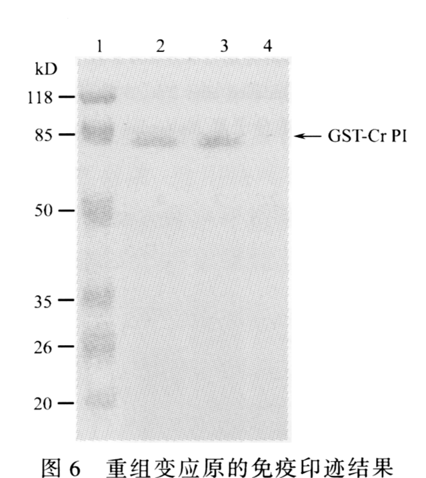


图 6　重组变应原的免疫印迹结果

Fig. 6　Western blot analysis of pGEX-Cr PI expression products in *E. coli*

1. 预染蛋白质标准 Prestained protein marker; 2～3. 重组菌诱导后印迹结果 BL21/ pGEX-Cr PI after IPTG induction; 4. 空质粒菌诱导后印迹结果 BL21/ pGEX after IPTG induction.

3　讨论

为了获得大量高纯度的变应原,我们将 Cr PI 基因亚克隆入原核表达载体 pGEX-5X-1,由于法玛西亚公司的 pGEX-5X-1 表达载体(27-4584)的多克隆位点与 λEXcell *Not* Ⅰ/ *Eco*R Ⅰ/CIP(27-5013)的定向克隆插入片段相匹配,故经 *Eco*R Ⅰ 和 *Not* Ⅰ 双酶切的 pGEX-5X-1 可直接接受并表达经双酶切来自噬菌体克隆的 Cr PI 基因片段,表达质粒经测序证实读框完全正确。蟑螂 Cr PI 变应原在大肠杆菌中获得高效表达,但主要以包涵体形式存在于沉淀中。有学者通过改善诱导条件,使目的蛋白的可溶性提高(Nguyen *et al.*, 1996; Jin, 1999)。但在本研究中,各种诱导条件的优化(如表达菌株,诱导温度,诱导剂浓度及诱导时间等)都未能显著改善目的蛋白的可溶性。由于 Glutathione Sepharose 4B 亲和层析胶在变性条件下不能与融合蛋白结合,因此有必要对 Cr PI 包涵体蛋白进行复性。包涵体蛋白的复性是一项复杂、困难的工作,需要寻求一种最适合的方法(Muller and Rinas, 1999; Yoshii *et al.*, 2000)。在复性蛋白浓度约 300 μg/mL 和精氨酸浓度 0.5 mol/L 的条件下,本研究采用稀释复性的方法取得较好复性效果,在透析去除精氨酸后,几乎未见沉淀。另外分步透析,使精氨酸浓度逐步下降也是保证复性成功的关键因素,这可能与精氨酸具有增大折叠中间体的溶解性而提高变性蛋白质的复性率有关(Buchner and Rudolph, 1991)。pGEX 表达系统是目前广泛使用的一种融合表达体系,它带有的 GST 部分本身的免疫原性不强,但却可利用它与 Glutathione Sepharose™ 4B 胶特异结合进行纯化。Cr PI 融合蛋白复性后,经一步亲和层析获得高效纯化。

IgE 是介导速发型变态反应的主要介质。变应原与结合在肥大细胞和嗜碱性粒细胞表面的特异性 IgE 交联,使肥大细胞和嗜碱性粒细胞脱颗粒,释放出诸如组胺、白三烯等生物活性介质,引起相应的临床症状(如过敏性休克、过敏性鼻炎和哮喘等)(Kay, 2001)。因此,与 IgE 抗体的结合能力是变应原的重要特征之一,变应原的线性表位和构象表位对于 IgE 的识别都是重要的(Wu *et al.*, 2002)。本研究的免疫印迹结果显示重组 Cr PI 变应原具有较好的 IgE 结合活性。

参 考 文 献 (References)

Arruda LK, Chapman MD, 2001. The role of cockroach allergens in asthma. *Curr. Opin. Pulm Med.*, 7(1): 14－19.

Arruda LK, Vailes LD, Hayden ML, Benjamin DC, Chapman MD, 1995. Cloning of cockroach allergen, Bla g 4, identifies ligand binding proteins (or calycins) as a cause of IgE antibody responses. *J. Biol. Chem.*, 270(52): 31 196－31 201.

Bernton HS, Brown H, 1964. Insect allergy-preliminary studies of the cockroach. *J. Allergy*, 35: 506－513.

Buchner J, Rudolph R, 1991. Renaturation, purification and characterization of recombinant Fab-fragment produced in *Escherichia coli*. *Biotechnology*, 9(2): 157－162.

Jin HJ, 1999. ermSF, a ribosomal RNA adenine N6-methyltransferase gene from *Streptomyces fradiae*, confers MLS (macrolide-lincosamide-

streptogramin B）resistance to *E. coli* when it is expressed. *Mol. Cells*，9(3)：252－257.

Kay AB，2001. Allergy and allergic diseases. Part Ⅰ. *N. Engl. J. Med.*，344(1)：30－37.

Lai NK，He ZL，Zou ZH，1992. Study on asthma induced by cockroach allergens. *Clin. J. Microbiol. Immunol.*，12(Suppl.)：34－36.［赖乃揆，贺紫兰，邹泽红，1992. 蟑螂变应原诱发哮喘的研究. 中华微生物学和免疫学杂志，12(Suppl.)：34－36］

Liu ZG，Huang JL，Zhu ZY，Zhou ZW，Liu YL，Gong SM，2001. Construction and primary characterization of cDNA expression library of *Periplaneta americana* nymph. *Clin. J. Microbiol. Immunol.*，21(Suppl.)：4－6.［刘志刚，黄炯烈，朱振宇，周珍文，刘玉琳，龚十妹，2001. 美洲大蠊若虫 cDNA 表达文库的构建和初步鉴定. 中华微生物学和免疫学杂志，21(Suppl.)：4－6］

Liu ZG，Huang JL，Yang H，Zhou ZW，Li JS，2002. Identification and analysis of major *Periplaneta americana* allergen Cr PI gene cloned from the Chinese mainland species. *Journal of Tropical Medicine*，2：131－134.［刘志刚，黄炯烈，杨慧，周珍文，李金生，2002. 美洲大蠊主要变应原 Cr PI 基因同源性分析. 热带医学杂志，2：131－134］

Muller C，Rinas U，1999. Renaturation of heterodimeric platelet-derived growth factor from inclusion bodies of recombinant *Escherichia coli* using size-exclusion chromatography. *J. Chromatogr. A.*，855(1)：203－213.

Nelson HS，Ikle D，Buchmeier A，1996. Studies of allergen extract stability: the effects of dilution and mixing. *J. Allergy Clin. Immunol.*，98：382－388.

Nguyen NY，Sackett D，Hirata RD，Levy DE，Enterline JC，Bekisz JB，Hirata MH，1996. Isolation of a biologically active soluble human interferon-alpha receptor-GST fusion protein expressed in *Escherichia coli*. *J. Interferon Cytokine Res.*，16(10)：835－844.

Wu CH，Lee MF，Liao SC，1995. Isolation and preliminary characterization of cDNA encoding American cockroach allergens. *J. Allergy Clin. Immunol.*，96(3)：352－359.

Wu CH，Lee MF，Yang JS，Tseng CY，2002. IgE-binding epitopes of the American cockroach Per a 1 allergen. *Mol. Immunol.*，39：459－464.

Yoshii H，Furuta T，Yonehara T，Ito D，Linko YY，Linko P，2000. Refolding of denatured/reduced lysozyme at high concentration with diafiltration. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*，64(6)：1 159－1 165.

（责任编辑：黄玲巧）